

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-12598

(43)公開日 平成9年(1997)1月14日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/805		8517-4H	C 0 7 K 14/805	
1/14			1/14	
1/32			1/32	

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平7-163599

(22)出願日 平成7年(1995)6月29日

(71)出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72)発明者 小林 幸司

大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学  
工業株式会社内

(54)【発明の名称】 ヘモグロビンの分離精製方法

(57)【要約】

【目的】 従来よりも、短時間で、簡単に、高収率で血液等から、ヘモグロビンを分離精製する方法を提供する。

【構成】 ヘモグロビンの2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケットに対して結合性を有する物質(例、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体)とヘモグロビン含有液とを、pH5.0~6.8の液体中で接触させて、該物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を生成させる工程、該複合体を該液体から分離する工程、及び、分離された複合体をpH7.0~10.0の液体に接触させるか、又は電気伝導度6.5mS/cm以上の液体に接触させて、該物質とヘモグロビンを解離させる工程からなることを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヘモグロビンの 2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケットに対して結合性を有する物質とヘモグロビン含有液とを、pH 5.0~6.8 の液体中で接触させて、該物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を生成させる工程、該複合体を該液体から分離する工程、及び、分離された複合体を pH 7.0~10.0 の液体に接触させるか、又は電気伝導度 6.5 mS/cm 以上の液体に接触させて、該物質とヘモグロビンを解離させる工程からなることを特徴とするヘモグロビンの分離精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヘモグロビンの分離精製方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ヘモグロビンは、血色素として酸素運搬にあずかる、ヘムとグロビンから構成される複合糖蛋白質であり、古くから、生理学、生化学、分子生物学の分野で最もよい研究素材の一つとして用いられてきている。また、ヘモグロビンは、臨床検査化学の分野では、種々の病態把握のための検査項目として広く測定されており、治療医学の分野では、代替人工赤血球の材料としても用いられるようになってきている。そのため、このように、利用価値の高いヘモグロビンを血液から簡単に、高収率で得る技術が望まれている。

【0003】 従来、ヘモグロビンの分離精製は、血液を遠心分離等の処理によって、血球と血漿成分に分離し、数度の遠心洗浄の後、低張塩処理などによって赤血球を溶血させ、その後、アルコール分画、電気泳動法、カラムクロマトグラフィー法等の通常の蛋白質の分離精製方法が採られてきた。例えば、特開昭 59-183370 号公報には、赤血球を等張塩化ナトリウム (NaCl) 溶液で洗浄後、溶血させて四塩化炭素あるいは、トルエンで脂質及び細胞残留物を除去する方法が開示されているが、このような方法は、非常に時間がかかり、熟練を要するものであり、また収率もよくないものであった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記従来の欠点を解決するものであり、その目的は、従来よりも、短時間で、簡単に、高収率で血液等から、ヘモグロビンを分離精製する方法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、ヘモグロビンの 2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケットに対して結合性を有する物質とヘモグロビン含有液とを、pH 5.0~6.8 の液体中で接触させて、該物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を生成させる工程、該複合体を該液体から分離する工程、及び、分離された複合

体を pH 7.0~10.0 の液体に接触させるか、又は電気伝導度 6.5 mS/cm 以上の液体に接触させて、該物質とヘモグロビンを解離させる工程からなることを特徴とするヘモグロビンの分離精製方法である。

【0006】 本発明の第 1 の工程は、ヘモグロビンの 2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケットに対して結合性を有する物質とヘモグロビン含有液とを、pH 5.0~6.8 の液体中で接触させて、該物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を生成させる工程である。

【0007】 上記の、ヘモグロビンの 2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケットについて説明する。ヘモグロビンは、一般に、図 1 の模式図に示されるような、2 つの  $\alpha$  鎖と 2 つの  $\beta$  鎖からなる 4 量体構造をしており、 $\beta$  鎖の会合部に 2, 3-ジホスホグリセリン酸が結合する部位が存在しており、この部位は 2, 3-ジホスホグリセリン酸ポケット (以下、DPG ポケットという) と呼ばれている。DPG ポケットは、図 1 にアミノ酸残基につけた N 末端からの通し番号で示したように、ヘモグロビンの  $\beta$  鎖のヒスチジン、リジンなどの塩基性アミノ酸残基、及び  $\beta$  鎖 N 末端バリリンによって形成されるカチオン性を帯びた部位であり、アニオン性の物質を結合し易い。血液中の 2, 3-ジホスホグリセリン酸は、この DPG ポケットに結合することにより、ヘモグロビンの酸素解離能をアロステリックに調節していることが知られている (今井清博、蛋白質、核酸、酵素、Vol.32 No. 6, 81-88, 1987)。

【0008】 本発明で用いられる、DPG ポケットに対して結合性を有する物質とは、DPG ポケットに対して結合性を有する化合物 (以下、DPG ポケットに対して結合性を有する化合物のことを、DPG ポケット結合性化合物という) が担持された担体、または、DPG ポケットに対して結合性を有する高分子化合物である。

【0009】 上記の DPG ポケット結合性化合物としては、特開昭 63-298063 号公報や特開平 2-25946 号公報に不安定型糖化ヘモグロビン解離剤として記載されているものが挙げられ、例えば、リン酸縮合体、フィチン酸およびフィチン酸塩のような多価リン酸化合物が挙げられる。

【0010】 リン酸縮合体としては、 $(HPO_3)_n$  ( $n$  は 2 以上の整数) で表されるメタリン酸、2 原子以上のリン原子を含み P-O-P 結合を有するポリリン酸またはそれらの類似体が挙げられる。メタリン酸としては、トリメタリン酸、テトラメタリン酸などが、ポリリン酸としては、ピロリン酸、テトラポリリン酸、などが挙げられる。

【0011】 また、DPG ポケット結合性化合物としては、他に、特開平 6-331629 号公報に不安定型糖化ヘモグロビン解離剤として記載されているものが挙げられ、例えば、アンモニア、1 級アミンまたは 2 級アミンの窒素原子に結合した少なくとも一つの水素原子がメ

チレンホスホン酸基 ( $-CH_2PO_3H_2$ ) に置換されてなる化合物が挙げられる。上記アミンとしては、種々のアルキルモノアミンやアミノ酸、直鎖アルキレンジアミン、ジアミノシクロヘキサン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラアミン、グリコールエーテルジアミン等が挙げられる。また、上記分子中の水素原子がアルキル基、水酸基などに置換された化合物、例えばエチレンジアミンの 1 置換体として、水素原子がメチル基に置換されて得られる 1, 2-ジアミノプロパン、プロピレンジアミンの 1 置換体として、2 の位置の炭素に結合する水素原子が水酸基に置換された 1, 3-ジアミノ-2-プロパノール等が挙げられる。

【0012】前記のメチレンホスホン酸基置換体の製造方法は、古くから種々の方法が知られているが、例えば、Irani, R. R. 等、J. Org. Chem. 31, 1603 (1966) によって開発された方法が挙げられる。この方法は、アミン、ホルマリン、及び亜リン酸の Mannich 反応を利用したものであり、ホスホン酸誘導体の合成方法として優れた方法である。また、Motekaitis, R. J. 等、J. inorg. nucl. Chem. 33, 3353 (1971) によって開発された方法も該置換体の製造方法として利用できる。この方法は、クロロメチレンホスフィン酸を用いて、まずアミノ基の水素原子をメチレンホスフィン酸に置換し、続いて塩化水銀を加えて加熱し、メチレンホスフィン酸をメチレンホスホン酸に酸化する方法であり、得られるメチレンホスホン酸置換体の純度も高く好ましい方法である。

【0013】本発明で用いられる担体とは、前述の DPG ポケット結合性物質を固定化し得る、種々の水溶性ポリマーや、従来から生化学分野で担体として使用されてきた種々の水不溶性物質が挙げられる。

【0014】上記の水溶性ポリマーとしては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸及びその塩、ポリアミノ酸等が挙げられる。

【0015】上記の水不溶性物質としては、例えば、架橋デキストランや架橋アガロースのようなクロマトグラフィー用担体として使用されてきたもの；ポリスチレンビーズのようなポリマービーズ；ガラスビーズ；ポリスチレンラテックスのようなラテックス粒子等が挙げられる。

【0016】担体に DPG ポケット結合性化合物を担持させる方法は、DPG ポケット結合性物質または水溶性ポリマーもしくは水不溶性担体の種類に応じて、従来の種々の方法が利用できる。例えば、前述の DPG ポケット結合性物質または水溶性ポリマーもしくは水不溶性担体のいずれか一方の水酸基をプロモシアンで活性化し、他方のアミノ基と反応させる方法や、両方のアミノ基をグルタルアルデヒドで架橋する方法や、いずれか一方のカルボキシル基と他方のアミノ基とを水溶性カルボジミドのような試薬で縮合させる方法等の化学結合法が挙げられる。また、水不溶性担体の場合、DPG ポケット

結合性物質を予めアルブミンなどの蛋白質に前記化学結合法により結合し、この結合物を水不溶性担体に物理吸着させることもできる。

【0017】また、本発明で用いられる、DPG ポケットに対して結合性を有する高分子化合物とは、1 級アミンまたは 2 級アミンを有するポリマー、例えばポリアリルアミンやポリリジンなどのポリマーの窒素原子に結合した少なくとも一つの水素原子がメチレンホスホン酸基 ( $-CH_2PO_3H_2$ ) に置換された構造の高分子化合物やビニルホスホン酸のようなホスホン基を有するモノマーの重合体が挙げられる。上記の 1 級アミンまたは 2 級アミンを有するポリマーの窒素原子に結合した少なくとも一つの水素原子がメチレンホスホン酸基 ( $-CH_2PO_3H_2$ ) に置換された構造の高分子化合物の製造方法は、1 級または 2 級アミンを有するポリマーを直接前述のような反応を介してメチルホスホン化する方法が挙げられる。

【0018】ヘモグロビンの DPG ポケットに対して結合性を有する上述したような種々の物質は、多価のリン酸基やホスホン酸基というアニオン性官能基を有するため、カチオン性を帯びた DPG ポケットに結合することができる。この結合は、イオン相互作用によって生じているため、上記の DPG ポケットに対して結合性を有する物質（以下、DPG ポケットに対して結合性を有する物質のことを、DPG ポケット結合性物質という）とヘモグロビンの反応は、後述の実施例から明らかなように、反応溶液の pH やイオン強度に強く影響を受ける。

【0019】本発明において DPG ポケット結合性物質とヘモグロビン含有液とを接触させて、該物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を生成させる工程は、反応の媒体である液体の pH が 5.0 ~ 6.8 の範囲で行われる。pH が 5.0 よりも低くなると、蛋白質の変性により、ヘモグロビン以外の蛋白質が不純物として混入する恐れが有り、6.8 より高くなると、ヘモグロビンとの結合反応が極度に低下する。

【0020】上記の反応の媒体である液体としては、水でもよいが、より好ましくは、5.0 ~ 6.8 の pH の範囲で緩衝能を有するリン酸緩衝液や、クエン酸緩衝液、フタル酸緩衝液等が好適である。

【0021】本工程に用いられるヘモグロビン含有液とは、例えば、血液の溶血液など、ヘモグロビンを含む溶液であれば種類を問わない。

【0022】本発明の第 2 の工程は、DPG ポケット結合性物質にヘモグロビンが結合された水不溶性の複合体を反応媒体である液体から分離する工程である。

【0023】上記の分離方法としては、上記の複合体生成反応終了後の液体を単に静置するか、または、より短時間で分離するには、遠心分離などの手段を用いて、該複合体を沈殿させた後、デカンテーション等の手段で液体を除去することにより分離できる。

【0024】本発明の第3の工程は、上記のようにして分離された複合体をpH7.0～10.0の液体に接触させるか、又は電気伝導度6.5mS/cm以上の液体に接触させて、DPGポケット結合性物質とヘモグロビンを解離させる工程である。

【0025】上記のpH7.0～10.0の液体としては、7.0～10.0のpHの範囲で緩衝能を有するリン酸緩衝液や、Goodの緩衝液、ホウ酸緩衝液、重炭酸緩衝液等が好適である。pHが7.0未満では、複合体の解離効果が不十分であり、pHが10を超えると、ヘモグロビンが変性する恐れがある。

【0026】上記の電気伝導度6.5mS/cm以上の液体としては、例えば、水に溶けてイオン化する物質の溶液が挙げられる。上記のイオン化する物質としては、特に限定されないが、水への解離度が高い強酸と強塩基より得られる塩が反応媒体のpHを変動させにくいので好適であり、例えば、塩化ナトリウムや塩化カリウム等が好ましい。この液体の電気伝導度が6.5mS/cm未満になると、複合体の解離効果が不十分であり、一方、適用可能な溶液の電気伝導度の上限値は、そのイオン化する物質の水に対する飽和溶解度における電気伝導度まで使用可能である。この場合、イオン化する物質の水溶液中の濃度が高くなり、解離後のヘモグロビンが塩析効果により沈殿する場合は、該溶液を分離した後、ヘモグロビンを他の適当な液体に溶解すればよい。

【0027】この工程によって、DPGポケット結合性物質とヘモグロビンを解離した後に、DPGポケット結合性物質が水不溶性である場合には、上澄み液としてヘモグロビンを回収することができ、DPGポケット結合性物質が水溶性である場合には、この状態のままヘモグロビン溶液として用いることもできるし、必要に応じて、アニオン吸着樹脂などを用いてDPGポケット結合性物質を除くこともできる。

【0028】また、上記の第1工程のDPGポケット結合性物質とヘモグロビンの複合体を生成させる工程および第3工程の上記複合体を解離させる工程で使用される反応媒体である液体の最適のイオン強度は、用いるDPGポケット結合性物質の種類や濃度、ヘモグロビン濃度、pHによって変化し、目的に応じて最適のイオン強度が選択されるべきである。例えば、DPGポケット結合性物質としてポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を用い、ヘモグロビン含有液として血液を用い、複合体の解離物質として塩化ナトリウムを用いた場合を取り上げると、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体濃度0.002～0.02重量%、反応溶液のpH5.0～7.0、血液の希釈度250～1000倍希釈のそれぞれの変動させる条件の中から、ある一つの条件を設定した場合、塩化ナトリウム濃度を10～100mMの範囲から最適の条件を設定することができる。

【0029】また、上記の第1工程で、ヘモグロビン含

有液として血液を用いる場合、赤血球をまず溶血させる必要がある。赤血球の溶血方法としては既存の種々の方法を用いることができるが、例えば、古くからよく知られる蒸留水等の低張液での処理や、血液の凍結融解により赤血球を破壊せしめる方法が挙げられ、また、通常、よく用いられる種々の溶血剤で処理してもよい。このような溶血剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテル；高級脂肪族アルコール；スルホネート化合物またはサルフェート化合物のポリオキシエチレンエーテル；ソルビット脂肪酸エステル；のポリオキシエチレン付加体等の界面活性剤が使用できる。溶血剤の使用量は、その種類等によっても異なるが、通常血液1ml当たり、10～200mgである。溶血剤が過剰である場合には、DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応が阻害される場合があり、溶血液の適当な希釈が必要である。

【0030】また、本発明のヘモグロビンの分離精製方法は、天然ヘモグロビン(Fe<sup>2+</sup>)だけでなく、シアンメトヘモグロビン(Fe<sup>3+</sup>)でも同様に適用できるので、安定なヘモグロビン標準物質としてシアンメトヘモグロビンを分離調製する際にも好適に用いられる。

【0031】

【実施例】次に本発明を実施例によって説明するが、本発明はこの実施例に制限されるものではない。

【0032】(参考例1)

ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体の合成

ポリアリルアミン塩酸塩(日東紡績社製、MW.7500～11,000)5.7gとホスホン酸(ナカライテスク社製)16.4gを100mlの脱イオン水に溶解し、500mlのセパラブルフラスコに入れた。これに、温度計、攪拌棒、環流管、滴下ロートをセットした。次に、濃塩酸(11.33N)100mlを添加し、マントルヒーターにて加熱した。次に環流状態に達したところで、滴下ロートに60mlのホルムアルデヒド水(37重量%)を入れ、1時間かけてゆっくり滴下した。それからさらに、1時間反応を続けた。次に、この溶液を20℃に冷却し、水酸化ナトリウム54gを加えた。次にこの溶液を約800mlのアセトンにコマゴメベットを用いゆっくり滴下し、白色沈殿を生成させた。この沈殿物を吸引ロートを用いて濾過した。沈殿物は、アセトン：水＝4：1の溶液で3回洗浄濾過し、沈殿物をスパーテルでサンプル瓶に回収し、約200mlの脱イオン水を少量ずつ加えながら、沈殿物を泥濘状にし、これを透析チューブにつめ、脱イオン水に一昼夜以上、外液を5回交換して、透析した。透析チューブ内で溶解したポリアリルアミンのホスホン酸誘導体をもう一度アセトンに滴下し、沈殿させ、上記のように濾過し、沈殿物を20℃で減圧乾燥して6.4gのポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を得た。

【0033】(参考例2)

#### DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応性評価

DPGポケット結合性物質として、参考例1で合成したポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を使用し、そのヒトヘモグロビンとの反応性を評価した。ヒトヘモグロビンはSigma社より購入したものをを用いた。反応緩衝液として、10mMの濃度でNaClを含有する10mMリン酸緩衝液(pH=6.24)を用い、この反応緩衝液に図2にHb Conc.として示した0.2~0.6mg/mlの最終濃度でヒトヘモグロビンを溶解した。次に、この溶液に上記ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を最終濃度0.004重量%になるように添加し、20℃で5分間攪拌しながら反応させた後、溶液の濁度を紫外可視分光光度計(島津製作所製UV260)で、波長660nmの吸光度(OD660nm)で測定した。この結果を図2に示した。図2から明らかなようにポリアリルアミンのホスホン酸誘導体は、ヒトヘモグロビンと反応し、ヒトヘモグロビンの濃度に依存して濁度が増加し、水不溶性複合体が形成されることが示された。

【0034】(参考比較例1)ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体(最終濃度0.004重量%)の代わりにポリアリルアミン塩酸塩(最終濃度0.004重量%)を用いたこと以外は、参考例2と同様に行った。結果は、図2に参考例2の結果と一緒に示した。この結果から明らかなように、ホスホン酸誘導体化していないポリアリルアミンは、ヒトヘモグロビンと反応しなかった。

【0035】(参考例3)

#### DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応性評価(pH依存性)

1/15Mリン酸2ナトリウム水溶液と1/15Mリン酸1カリウム水溶液とを種々の比率で混合し、図3に示したようにpH5.2~8.4のSørensenのリン酸緩衝液を調製し、それを10mMになるように脱イオン水で希釈した。各々のpHの緩衝液にヒトヘモグロビン(Sigma社)を最終濃度0.3mg/mlになるように溶解した。次に、参考例1で得られたポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を最終濃度0.004重量%になるように添加し、20℃で5分間攪拌しながら反応させた後、溶液の濁度を紫外可視分光光度計(島津製作所製UV260)で、波長660nmの吸光度(OD660nm)で測定した。この結果を図3に示した。図3から明らかなようにポリアリルアミンのホスホン酸誘導体は、pH5.0~7.0でヒトヘモグロビンと反応し、濁度が増加した。また、pHが7.0を超えると濁度が急激に低下していることが分かる。

【0036】(参考例4)

#### DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応性評価(電気伝導度依存性)

反応緩衝液に10mMリン酸緩衝液を使用し、これにN

aClを溶解し、図4および図5に示したような電気伝導度(Electric Conductivity)1.335~9.75mS/cmの緩衝液を調製した。各々の電気伝導度の緩衝液にヒトヘモグロビン(Sigma社)を最終濃度が0.25mg/mlになるように溶解した。次に、参考例1で得られたポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を添加し、20℃で5分間攪拌しながら反応させた後、溶液の濁度を紫外可視分光光度計(島津製作所製UV260)で、波長660nmの吸光度(OD660nm)で測定した。この結果を図4および図5に示した。なお、図4は、リン酸緩衝液のpH6.24、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体の反応時の濃度が0.004重量%の場合の結果を、図5は、リン酸緩衝液のpH6.00、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体の反応時の濃度が0.006重量%の場合の結果を示した。図4および図5から明らかなようにポリアリルアミンのホスホン酸誘導体とヒトヘモグロビンとの反応による濁度は、反応時のpHやポリアリルアミンのホスホン酸誘導体の濃度が変わると電気伝導度依存性も異なるパターンを示し、各条件により最適の電気伝導度(言い換えると、NaCl濃度)があることが分かる。

【0037】(参考例5)

#### DPGポケット結合性物質の反応特異性の評価

参考例1で得られたポリアリルアミンのホスホン酸誘導体の特異性を評価した。反応緩衝液として、10mMの濃度でNaClを含有する10mMリン酸緩衝液(pH=6.21)を用い、これに、ヒトヘモグロビン(Sigma社)(終濃度0.25mg/ml)、牛アルブミン(MILES社)(終濃度0.25mg/ml)またはヒト血漿希釈液(最終希釈度250倍)を上記の括弧内の終濃度または最終希釈度となるように添加し、次いで上記のポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を図6に示した0.00~0.05重量%の範囲の種々の濃度となるように添加し、20℃で5分間攪拌しながら反応させた後、溶液の濁度を紫外可視分光光度計(島津製作所製UV260)で、波長660nmの吸光度(OD660nm)で測定した。この結果を図6に示した。図6から、明らかなようにポリアリルアミンのホスホン酸誘導体は、ヘモグロビンとは反応し、牛アルブミンや血漿希釈液とは反応しなかった。

【0038】(実施例1)

#### ヒト血液からのヘモグロビンの分離精製

正常ヒト血液100μlに蒸留水12.5mlを添加し、次に、50mMの濃度でNaClを、0.012重量%の濃度で参考例1で得られたポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を溶解している10mMリン酸緩衝液(pH=6.00)を12.5ml添加し、攪拌後、4℃で24時間静置した。次に上澄み液と赤色の沈殿物をデカンテーションで分離した。得られた赤色の沈殿物に、ダルベッコのリン酸緩衝液(pH=7.4, 138

10

20

30

40

50

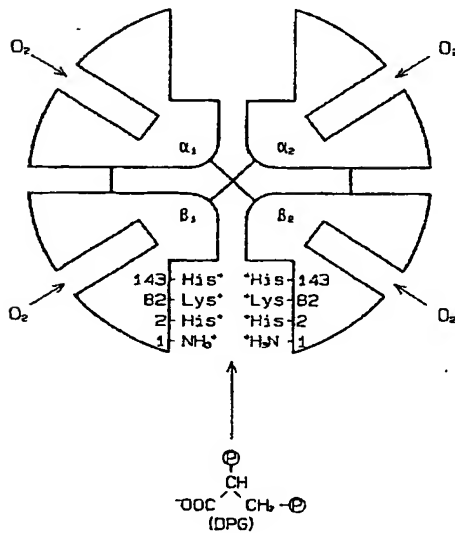
mMNaCl)を25ml添加し、沈殿物を再溶解させた。この再溶解溶液(後出の図7および表1において、この液のことを、精製品という)；先に分離した上澄み液；および上記の正常ヒト血液100 $\mu$ lに蒸留水12.5mlを添加した液に、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を含むリン酸緩衝液12.5mlの代わりに、ポリアリルアミンのホスホン酸誘導体を含まないリン酸緩衝液12.5mlを添加した液(後出の図7および表1において、この液のことを、出発原料という)、それぞれの波長240~700nmの吸収曲線を比較し、図7に示した。また、540nmの吸光度の値から正常ヒト血液中のヘモグロビンの回収率を測定し、結果を表1に示した。

【0039】

【表1】

吸光度	出発原料	0.315
	上澄み液	0.054
	精製品	0.254
回収率(%)		80.6

【図1】



【0040】

【発明の効果】本発明の構成は上記の通りであり、DPGポケット結合性物質を利用し、従来よりも、短時間で、簡単な操作で、高収率で、血液等からヘモグロビンを分離精製できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヘモグロビンの構造を示す模式図である。

【図2】DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応性を示すグラフである。

【図3】DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応における、反応時のpH依存性を示すグラフである。

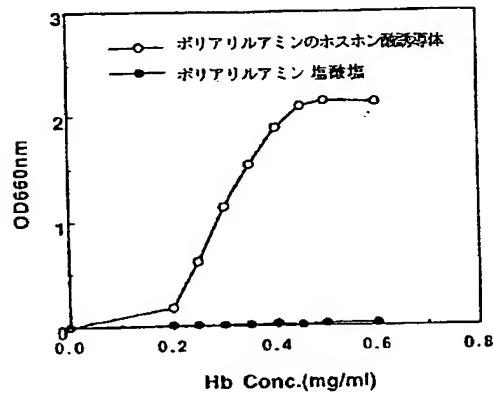
【図4】DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応における、反応時の溶液の電気伝導度依存性を示すグラフである。

【図5】DPGポケット結合性物質とヘモグロビンとの反応における、反応時の溶液の電気伝導度依存性を示すグラフである。

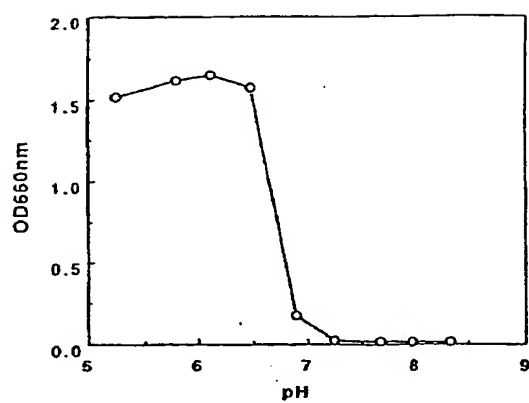
【図6】DPGポケット結合性物質の反応特異性を示すグラフである。

【図7】ヒト血液からヘモグロビンの分離精製を行った際の、出発原料、上澄み液、精製品の波長240~700nmの吸収曲線である。

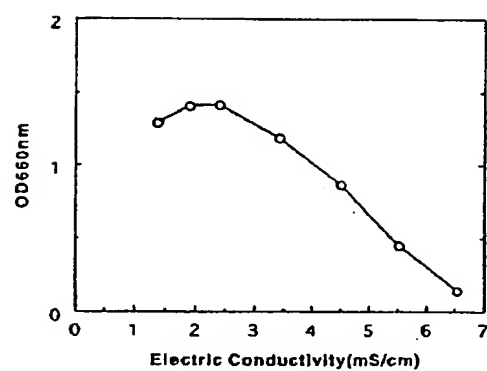
【図2】



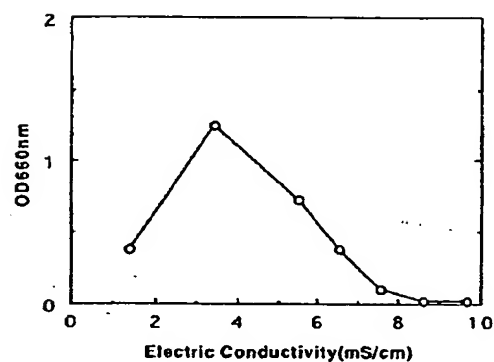
【図3】



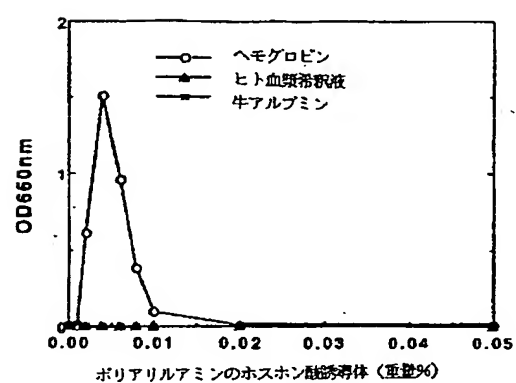
【図4】



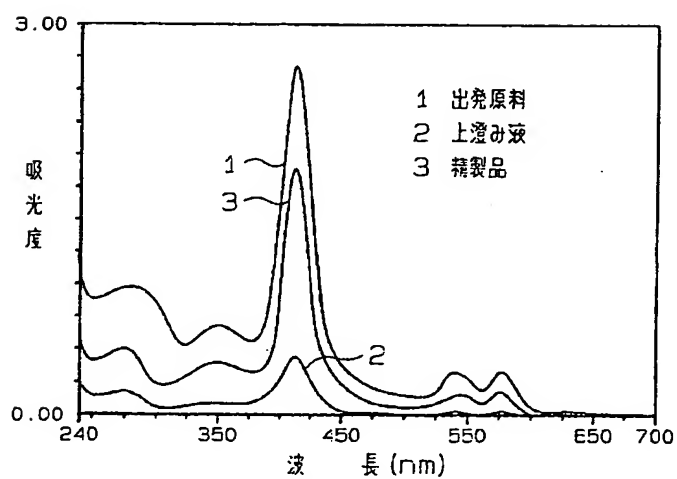
【図5】



【図6】



【図7】



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**